생명과학회지
Korean J. Life Science, 8(4), 353-359, 1998

엉컹퀴에서 분리정제한 Silybin 의 Human Low Density Lipoprotein 수식에 대한 항산화 효과

류병호† · 김희숙 · 이백천* · 이홍수**

경성대학교 식품공학과
*순천당제약(주)
**사하보건소

Antioxidative Effect of Silybin Purified from *Silybum marianum* on Modification of Human Low Density Lipoprotein

Beung-Ho Ryu†, Hee-Suck Kim, Baek-Cheon Lee*, and Hong-Su Lee**

Department of Food Science and Biotechnology Kyungsung University, Pusan 608-736, Korea
**Sunchon Dang Pharmacetical co. Pusan 604-042, Korea.*
***Saha health center, Pusan 604-032, Korea*

Abstract

This study was initiated to antioxidant activity of silybin on oxidation of human low density lipoproteins(LDL). Silybin was extracted from *Silybum marianum* by the combination of fractionation and it was further purified by silica gel column chromatography, and isolated active substances were identified as silybin by IR, NMR and GC-MS.

Silybin inhibited the oxidation of human low density lipoprotein(LDL) mediated by 5μm Cu^{2+} ion in a dose dependent manner. LDL oxidation by congugated dienes formation was completely inhibited by silybin at a concentration of 50μM. The results provide a possibility that silybin might protect LDL against oxidation in atherosclerotic lessions.

Key words : *Silybin, low density lipoprotein, antioxidant*

서 론

플라보노이드는 식물성 성분으로 다양한 구조적 특성을 가지고 있으며 벤젠환(環)의 탄소에 -OH기와 탄소의 2와 3의 위치에 2중결합, 탄소 4번 위치에 카보닐기와 A와 B 환에 결합되어 있는 -OH기에 의하여 항산화 활성을 갖는다[1~3]. 플라보노이드(flavonoid)는 식물계에 널리 분포되어 있는 폴리페놀계 화합물로서 약 4,000여 종류가 있으며 그 중 flavonols, flavones, flavanones, flavanols, anthocyanidins, isoflavones, dihydroflavonols 및 chalcones 등이 주요한 플라보노이드로 알려져 있다[4~6]. 플라보노이드를 21~22세의 건강한 사람에게 4g을 경구 투여한 후 폴리페놀 화합물 및 그 유도체를 조사한 결과 혈장과 뇨에서는 검출되지 않았으며, 투여량의 53%는 그대로 분변으로 배

† Corresponding author

설되었다고 보고하였으며[7,8] 인체에서 플라보노이드의 대사에 관한 연구에서 플라보노이드는 인체에서 생리활성을 나타내는 섭취량은 23~170 ㎎/day 정도라고 하였다. 플라보노이드의 흡수 및 대사는 쥐를 이용한 실험에서 소화관을 통하여 흡수된다는 사실을 일부 규명하였고, 한편으로는 지질대사의 산화를 억제 한다는 사실이 밝혀졌다[8].

이와 같이 플라보노이드는 생리활성이 뛰어나 우리의 건강을 유지하는데 큰 역할을 한다. 현재까지 연구된 플라보노이드는 항균제[10], 항바이러스제[11], 항염제[12], 지질의 과산화의 억제[13] 및 항돌연변이의 활성[14,15]을 나타내며, 특히 혈장의 low density lipoprotein(LDL)의 산화를 억제하여 동맥경화를 예방한다[6,16].

LDL은 *in vitro*에서 macrophages[17], 동물의 내피세포[18], 평활근 세포[19] 및 금속이온의 존재하에서도 Oxid LDL로 유도되고[20] Oxid LDL은 높은 세포 독성이 있는 aldehyde등 지질의 과산화물을 함유하고 있고, 세포조직에 확산되어 독성을 나타낼뿐만 아니라 내피세포에 염증을 일으키고 결국에는 동맥경화를 유발하게 된다[21,22].

지금까지 LDL의 산화를 억제하는 천연 항산화제로는 비타민 E[23], carote-noids[24], catechin[25], flavonoid[16] 및 그 유도체 등이 알려져 있고, 특히 국화과(*Compositae*)에 속하는 엉겅퀴(*Silybum marianum*)에 들어있는 silybin는 flavolignan으로서 간장보호작용[25,26]과 알코올 유도지질 산화의 예방[27] 및 간경화[28] 등에 대한 보호효과가 있다고 알려져 왔다.

따라서 본 연구는 엉겅퀴(*Silybum marianum*)에 들어있는 플라보노이드의 일종인 silybin를 분리 정제하고 사람 LDL에 산화에 대하여 항산화 효과 실험하였다.

재료 및 실험방법

재료의 구입

엉겅퀴(*Silybum marianum*(L))는 시중 한의원에서 구입하여 사용하였다.

시약

Diphenyl-picryl-hydrazyl(DPPH), gentamycin, sodium thiobarbiturate는 Sigma Co.에서 구입하였고, silicagel 60는 Merck Co.에서 구입하였다. Ethyl acetate 등 용매는 Baker Co.에서 구입하여 사용하였고 그외 시약은 특급을 사용하였다.

엉겅퀴로부터 silybin의 분리 및 정제

엉겅퀴 5㎏을 분쇄한 후 메탄올 1ℓ로서 9시간씩 8회 추출하고 혼합액을 합하여 농축하였다. 농축 엑스분을 같은 량의 물을 가하여 분해시키고 석유 벤젠을 가하여 탈지한 후 초산 에칠로서 추출, 농축하여 엑스분 228g을 얻었다. Silica gel chromatography column(5×50㎝)에 충진한 후 초산에칠 엑스분을 첨가한 후 벤젠 대 초산에칠(5 : 1 v/v), 벤젠 대 초산에칠(1 : 1 v/v), 초산에칠 및 메탄올의 순서로 용출하였다. 벤젠 대 초산에칠(1 : 1 v/v) 및 초산에칠 용출획분을 합하고 여기에 메탄올을 가하여 용해시켜 하룻밤 방치시켜 담황색의 침전을 얻었다. 생성된 침전을 아세톤, 석유에텔로 재결정하여 silybin의 무색 비늘형의 결정을 얻었다[29].

Silybin의 구조확인

I.R. Spectrum은 Perkin Elmer 841(USA), NMR Spectrum은 Brucker AM 300 spectrophotometer(USA)로서 샘플을 DMSO에 녹여 얻었다. GC/MS는 Hitachi M-80(Japan)으로 측정하였다. Silybin의 표준품은 Sigma Co.(USA) 에서 구입하여 정제된 시료와 비교 확인하였다.

사람 Low Density Lipoprotein(LDL)의 분리

사람 LDL의 분리는 Havel 등의 방법[30]에 따라 실시하였다. 건강한 남자의 혈액 50ml을 1mg/ml EDTA를 함유한 plastic 시험관에 넣어 교반한 후 4℃에서 3시간 방치하였다. 혈액 속의 plasma는 상온에서 20분 동안 원심분리(2,000×g)한 다음 gentamycin sulfate(1mg/25ml)을 첨가하고 초고속 원심분리기(46,000×g)로 24시간 동안 분리하여 LDL를 얻었다. 분리된 LDL은 0.15M NaCl, 0.01 % EDTA가 함유된 0.01M phosphate buffer(pH 7.4)로서 16~20시간 투석하였다.

LDL의 Cu^{2+}에 의한 산화

5㎛M $CuSO_4$를 함유한 phosphate buffer saline(PBS)에 적당한 농도의 silybin을 첨가하여 5% CO_2 존재하에서 37℃에서 24시간 배양하여 LDL의 산화를 측정하였다. 별도로

대조군은 이 용액에 silybin을 첨가하지 않은 조건에서 배양하였다[31].

Thiobarbituric acid reacting substances(TBARS)의 측정

LDL의 산화는 TBARS의 형성으로서 평가하였다. 100㎍ protein/㎖ LDL이 함유된 배양 혼합액 0.5ml에 20% TCA 1.5ml를 가한 다음 여기에 0.05M NaOH에 0.67% TBA 1.5ml을 넣어 섞은 후 그 반응 혼합액을 90℃ 에서 45분간 끓였다. 시료를 10분간 원심분리(2,000×g)한 다음 상등액의 형광을 Perkin-Elmer fluorescence spectrophotometer(Model 650-10S, USA)로서 510 및 553nm 에서 측정하였다. 시료 중의 TBARS의 수는 malonaldehyde (MDA)로서 만들어진 MDA의 표준곡선으로 부터 MDA의 nmole로서 나타내었다[32].

Diene conjugation의 측정

LDL이 Oxid LDL로 되므로서 생성가능한 공액 2중결합의 형성을 234nm에서 측정하였다. 즉 100㎍ protein/㎖ 의 LDL을 PBS(pH 7.4)에 녹이고, 5㎛M $CuSO_4$ 및 50㎛M silybin의 존재하에서 37℃에서 배양하면서 매 30분 간격으로 측정하였다. 별도로 대조구로서는 50㎛M silybin를 첨가하지 않은 상태에서 측정하였다[31].

단백질의 정량

LDL의 단백질의 정량은 Lowry등의 방법[33]에 따라 측정하였다.

결과 및 고찰

Silybin의 정제 및 구조확인

엉겅퀴(*slybum marianum* L.)에서 추출 정제한 silybin($C_{25}H_{22}O_{10}$, mp 253~255℃)은 담황색 침상결정으로 $FeCl_3$, Mg-HCl 반응은 양성으로 나타났다. Fig. 1은 IR spectrum에서는 3,454㎝$^{-1}$에 OH-, 1,660㎝$^{-1}$에서 conjugated carbonyl기 및 1,500㎝$^{-1}$에서 benzene ring을 나타내어 flavonoid로 추정할 수 있다[34].

Fig. 2는 silybin을 NMR(DMSO)로서 측정한 것으로 2중 공명을 사용한 coupling의 실험 결과로서 각 1 signal의

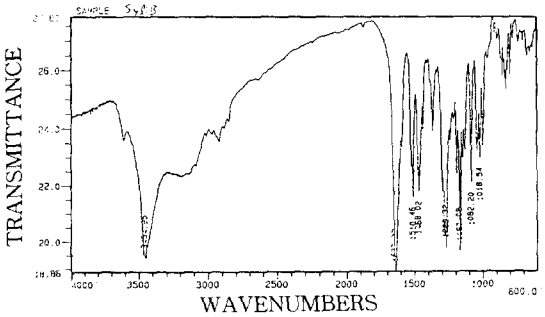

Fig. 1 IR spectrum of silybin

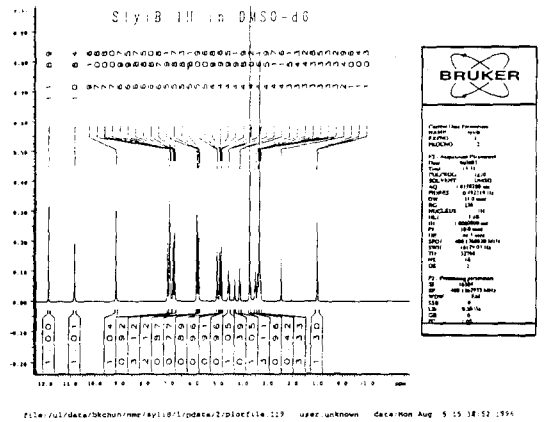

Fig. 2 ^{1}H-NMR spectrum of silybin

귀속을 조사하였다. Silybin은 ^{1}H에서는 3.70, 3.80ppm의 각 ^{1}H 상당의 2중선(二重線)은 A환(環)의 6, 8위치의 수소에 귀속되며 7.10ppm(1H, d, J=2HZ)는 각각 B환(環)의 5′, 6′, 2′위치의 수소에 해당하는 것으로 생각된다. 그리고 6.80~7.05ppm의 미분화에서 ^{3}H상당의 방향환의 수소에 기본으로 하는 signal이 확인되었다[35].

한편 3.5ppm(^{2}H, m),4.27(^{1}H, m), 4.98ppm(^{1}H, d, J=8HZ)의 signal group은 4.27ppm를 조사하여도 그 값에서 conferyl alcohol 유래의 -CH(O)-CH(O)-CH_2OH를 기본으로 하는 것으로 추정된다. 3.81ppm에 methoxy기가 들어있는 ^{3}H 상당의 일중선(一重線)이 확인되었다.

여기에 benzene ring 의 수소를 기본형으로 하여 ^{7}H이 확인되었다. 그리고 benzene ring의 7개의 수소에 6.18 ppm, 6.40ppm의 각 ^{1}H분의 1에 대하여 doublet(J=2Hz)

는 flavonol A ring의 6, 8위치의 수소, 또 7.58ppm, 7.61 ppm의 각 ^{1}H분의 1에 대한 doublet(J=2Hz)는 chemical shift값과 signal형을 고려하여 2', 6' 위치의 수소에 귀속된다(Fig. 3). Silybin은 2, 3위치에 수소 ^{2}H 상당의 signal이 인식되었으며, 이에 속하는 표준 silybin의 NMR 해석결과와 유사하였다[36]. Fig. 4에서 나타낸 바와 같이 silybin의 GC/MS spectrum은 m/e : 219, 131 및 59에서 fragment를 관찰할 수 있다.

Cu^{2+} mediated LDL의 산화

엉겅퀴에서 분리 · 정제한 silybin의 항산화 효과를 알아보기 위하여 human LDL에 silybin를 50μM로 희석하여 5 μM $CuSO_4$의 존재하에서 37℃에서 18시간 배양하였다.

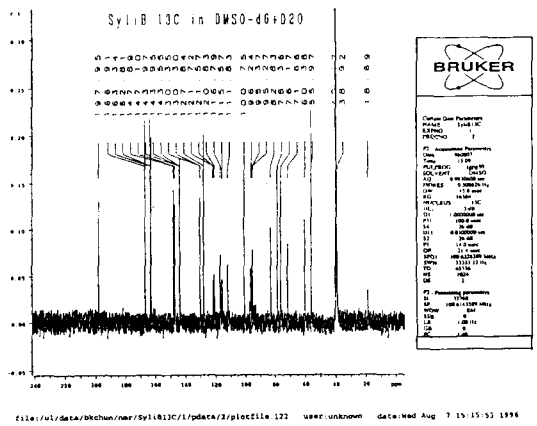

Fig. 3 ^{13}C NMR spectrum of silybin

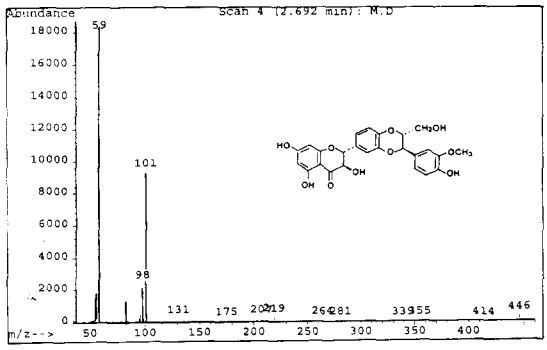

Fig. 4 GC-Mass spectrum of silybin

일반적으로 LDL을 산화시키기 위하여 $CuSO_4$가 5μM농도일 때 Cu^{2+}에 의한 산화가 잘 일어났다고 하였다[19,20]. Fig. 5에서 보는 바와 같이 5μM $CuSO_4$를 첨가하여 LDL을 산화시킬 때 silybin을 첨가하지 않은 대조군에서는 37.5 nmole MDA/㎎, LDL 이었으나, LDL에 silybin을 25μM 첨가하였을 때는 25.8nmole MDA/㎎, LDL이였으며 50 μM silybin을 첨가한 경우 malondialdehyde가 거의 생성되지 않았다. 그러므로 silybin은 금속매개 LDL에 대하여 항산화 활성이 우수하였다. Silybin을 50μM 첨가하였을 때 과산화물의 생성 억제가 가장 높게 나타났다. 그러므로 앞으로 실험에서 사용되는 $CuSO_4$는 50μM 로 하였고, silybin의 농도는 50μM 로하여 실험하였다.

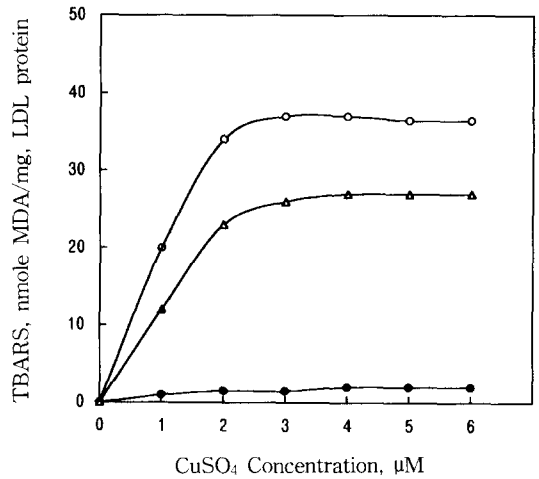

Fig. 5 Antioxidative effect of silybin on oxidation of LDL by cupric sulfate. ○-○, LDL+$CuSO_4$; △-△, LDL+$CuSO_4$ +25μM silybin ; ●-●, LDL+$CuSO_4$ +50μM silybin. LDL(100μg protein/ml) was incubated for 18hr at 37℃. Oxidation was initiated by the addition of 5μM $CuSO_4$ in the presence or absence of increasing concentration of silybin. The lipoperoxide content was determined and expressed as nmol malonaldehyde equivalents/㎖. Results are expressed as triplicate analyses.

Cu^{2+}유도 LDL산화에 대한 silybin의 억제효과

LDL의 산화는 여러 요인에 의하여 유도되지만 Cu^{2+}유도에 대하여 검토하였다. Silybin를 각각 5, 25 및 50㎛M의 농도로 5㎛M Cu^{2+}촉매하에서 6시간 및 18시간 반응시킨 후 산화 억제효과를 실험한 결과 Table 1과 같다.

Table 1. Antioxidative effect of silybin on the copper mediated oxidation of LDL. Antioxidative effect of silybin on the copper mediated oxidation of LDL. LDL(100㎍, protein/㎖) was incubated for 6h or 18hr at 37℃ in phosphate buffered saline containing 5㎛M $CuSO_4$ in the presence or absence of increasing concentration of silybin. At the end of the incubation periods, TBARS were determined fluorometrically as described in *Method*

Concentration(㎛m)	TBARS nmole MDA/㎎, LDL	
	6 hr	18 hr
Native LDL	1.24±0.08	-
0	19.90±0.24	57.28±0.42
5	12.40±0.78	35.60±0.60
25	6.37±0.22	17.80±0.43
50	2.95±0.30	13.00±0.12

본 실험에서 native LDL의 TBARS는 1.20±0.23nmol MDA/㎎ LDL이였으나 배양 6시간에서는 silybin를 첨가하지 않고 5㎛M $CuSO_4$만 첨가한 LDL에서는 19.9±0.24 nmol MDA/㎎, LDL이였다. Silybin의 첨가농도가 5, 25 및 50㎛M일 때 TBARS는 각각 12.40±0.78, 6.37±0.22 및 2.95±0.3 nmol MDA/㎎, LDL이였다. 이러한 실험 결과로 보아 배양 6시간 동안 silybin의 항산화 효과는 첨가량이 증가할수록 억제효과가 높아지는 용량 의존형 항산화제로 추정된다.

그리고 같은 조건에서 LDL의 산화를 위해 LDL에 5㎛M $CuSO_4$를 첨가하여 silybin의 항산화능을 알아보기 위하여 18시간 배양하였을 때 silybin을 첨가하지 않은 대조군에서의 TBARS는 57.28±0.42 nmol MDA/㎎, LDL이였으나 silybin를 5㎛M 첨가시에는 35.6±0.6 nmol MDA/㎎ LDL이였고, 25㎛M 첨가시에는 17.8±0.43 nmol MDA/㎎ LDL이였으며 50㎛M를 첨가시에는 3.0±1.24 nmol MDA/㎎, LDL이였다.

본 실험에서 LDL을 silybin 첨가 후 배양 6시간에서 산화억제력이 좋았으나 첨가농도가 낮은 경우에는 산화 억제효과가 낮아 용량에 따른 차이가 있었다. 그러나 첨가량이 50㎛M 일때는 6 및 18시간 배양에 따른 항산화능의 차이는 거의 없었다. Jialal과 Scaccini[37]는 Cu^{2+}의 존재하에서 LDL의 산화를 2~3시간 동안 단시간 배양한 후 TBARS를 측정하여 산화정도를 측정하였으나 본 실험에서 배양을 6시간 및 18시간 실험하였다. 이것은 개체에 따라 다르지만 사람의 혈장에서 채취하여 얻은 LDL에 존재하는 항산화제에 약간의 양향을 받기 때문이다[38]. 비타민 A 및 E 와 같은 항산화제가 LDL의 획분에 미량 함유 되어 있을 경우 항산화력을 있으나 반대로 담배를 피우는 사람은 혈액에서 산화가 쉽게 일어날 수 있기 때문에[21], 산화에 충분히 요구되는 18시간 동안 배양하였다. 이와 같이 LDL의 산화는 LDL 자체에 항산화제가 극미량 들어 있어도 산화가 잘 일어나지 않아 실험에 오차가 생길 우려가 있다.

따라서 LDL의 산화는 LDL의 농도가 증가하면 산화가 쉽게 일어날 가능성이 많아 본 실험에서는 LDL을 100㎍ protein/㎖로 조절하여 실험하였다. 이는 LDL의 저장동안에 LDL의 산화를 최소화 하기 위하여 희석용액도 높은 농도에서 저장해야 한다는 것을 암시하고 있다.

공액 이중결합 diene의 형성 억제효과

공액 이중결합의 형성은 LDL 의 산화과정을 측정하는 하나의 방법으로 본 실험에서는 silybin의 산화억제 효과를 조사하였다. Fig. 6에서 보는 바와 같이 LDL에 5㎛M $CuSO_4$를 첨가하고 silybin을 각각 50㎛M 첨가하여 37℃에서 배양하는 동안 배양시간에 따라 공액 이중결합이 증가하는 것을 볼 수 있었다. 이때 native LDL에 대한 공액2중 결합의 형성은 전혀 없었고 silybin을 50㎛M 첨가하여 시간 경과에 따른 공액 이중결합의 형성이 거의 찾아 볼 수 없었다. 그러나 LDL에 5㎛M $CuSO_4$를 산화시킨 경우에는 공액2중 결합이 많이 형성되는 것을 알수 있었다. Silybin은 isoflavonoid로서 화학적 구조가 이중결합의 형성을 억제하는 catechin 및 polyphenol 화합물과 그 구조적 특성이 비슷하여 에스텔화의 생성을 감소시키는 것으로 볼 수 있었다[39].

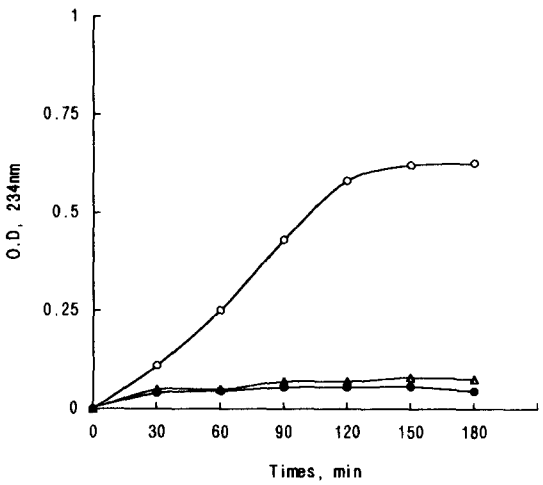

Fig. 6 Antioxidative effect of silybin on the formation of conjugated dienes observed during the oxidation of LDL. ○-○, LDL+50 μM $CuSO_4$; △-△, Native LDL ; ●-●, LDL+5μM $CuSO_4$+50μM silybin. LDL(100μg protein/㎖) was incubated in the present and absence of 50μM silybin. Oxidation was initiated by the addition of 5μM $CuSO_4$. The formation of conjugated dienes was measured from LDL oxidation.

요 약

본 연구는 사람의 low density lipoprotein(LDL)의 산화에 대한 항산화 효과를 조사하기 위하여 *Silybum marianum*으로부터 silybin를 분리 · 정제하여 실험하였다. Silybin은 유기용매 획분과 silica gel 칼럼 크로마토그래피로서 정제하여, IR. NMR 및 GC/MS로 확인하였다.

Silybin은 human low density lipoprotein(LDL)의 Cu^{2+} 촉매 산화에 있어 용량 의존형으로 나타내었고 50μM의 농도에서 LDL의 산화는 거의 완전히 억제하였다. 50μM Silybin의 농도에서 conjugated dienes 형성을 거의 억제하였다. 따라서 silybin은 LDL의 산화를 방지할 수 있을 것으로 추정된다.

참 고 문 헌

1. Ratty, A. K. and Das, N. P. : Effects of flavonoids on nonenzymic lipid peroxidation. Structure activity relationship, *Biochem. Med. Metabol. Biol.* 39, 69-79 (1988).
2. Hackett, A. M. : The metabolism of flavonoid compounds in mammals. In Plant Flavonoids in Biology and Medicine, Biochemical, Pharmacological and Structural Activity Relationships, p. 177, Alan R. Liss, New York, NY USA(1986).
3. Cody, V.(1988) : Crystal and molecular structure of flavonoids. In Plant Flavonoids in Biology and Medicine II, Biochemical, Cellular, and Medicinal Properties, p. 29, Alan R. Liss, New York, NY USA (1988)
4. Herrmann, K. : Flavonols and flavones in plants. A review, J. Food Technol., 11, 433-448(1976).
5. Kuhnau, J. : The flavonoids. A class of semi-essential food components, Their role in human nutrition, *World Rev. Nutr. Diet.*, 24, 117-191(1976).
6. Pierpoint, W. S. : Flavonoids in the human diet. In Plant Flavonoids in Biology and Medicine, Biochemical, Pharmacological and Structure -Activity Relationships, p. 125-140, Alan R. Liss, New York, NY USA(1986)
7. Bravo, L., Abia, R., Eastwood, M. A., and Saura-Clixto, F. : Degradation of polyphenols(catechin and tannic acid) in the rat intestinal tract. Effect on colonic fermentation and faecal output. Brit. J. Nutr. 71, 933-946(1994).
8. Das, N. P. : Studies on flavonoid metabolism. Absorption and metabolism of(+)-catechin in Man. *Biochem. Pharmacol.* 20, 3435-3445(1971)
9. Gugler, R., Leschik, M., and Dengler, H. J. : Disposition of quercetin in Man after single oral and intravenous doses. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 9, 229-234 (1975).
10. Cody, V., Middleton, E., and Harborme, J. B. : eds, Plant flavonoids in biology and medicine-biochemical, pharmacological, and structure, Alan R. Liss New York(1988).
11. Nonaka, G., Nishioka, L., Nishizawa. M., Yamagishi, T., Kashiwada, Y., Dutschman, G. E., Bodner, A. J., Kilkuskie, R. E., Cheng, Y. C., and K.H Lee : Inhibitory effects of tannins on HIV reverse transcriptase and HIV replication in H9 lymphocyte cells, *J. Natl. Prod.*, 53, 587-595(1990).
12. Hertog, M. G. L., Hollman. P. C. H., Katan, M. B., and Kromhout D : Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease. The Zutphen elderly study. *Lancet*, 342, 1007-1011(1993).
Das, N. P.(1990) eds. : Flavonoids in biology and medicine III -Curent issues in flavonoids research, Singapore. Singapore University Press(1990).
13. Kinsella, J. E., Frankel, E., German, B. and Kanner,

J. : Possible mechanisms for the protective role of antioxidants in wine and plant foods, *Food Technol.*, April, 85-88(1993).
14. Namiki, M. : Antioxidants/antimutagens in food. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, **29**, 273-88(1990).
15. Hertog, M. G. L., Hollman, P. C. H., Katan, M. B. and Kromhout, D. : Intake of potentially anticarcinogenic flavonoids and their determinats in adults in The Netherlands. *Nutr. Cancer,* **20**, 21-27(1993).
16. De Whalley, C. V., Rankin, S. M., H, oult, J. R. S., Jessup, W. and Leake, D. S : Flavonoids inhibit the oxidative modification of low density lipoproteins by macrophages, *Biochem. Pharmacol.*, **39**, 1743-19 51(1990).
17. Henriksen, T., Mahoney, E. M. and Steinberg, D. : Enhanced macrophage degradation of biologically modified low density lipoprotein, *Arteriosclerosis.*, 3, 149-159(1983).
18. Henriksen, T., Mahoney, E. and Steinberg, D. : Enhanced macrophage degradation of low density lipoportein previously incubated with cultured endothelial cells. Recognition by the receptor for acetylated low density lipoprotein, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA,* **78**, 6499-6503(1981).
19. Morel, D. W., Docorleto, P. E. and Chisolm, G. M. : Endothelial and smooth muscle cells alter low density lipoprotein *in vitro* by free radical oxidation, *Arterloscerosis* **4**, 357-364(1984).
20. Quinn, M. T., Parthasarathy S., Fong L. G. and Steinberg, D. : Oxidatively modified low density lipoproteins. A potential role in recruitment and retention of monocyte/macrophages during athero-genesis, *Proc. Natl. Acad. Sci.,* USA, **84**, 2995-2998(1987).
21. Carpenter, K. L. H., Brabbs, C, E. and Mitchinson, M. J. : Oxygen radicals and atherosclerosis, *Klin Wochenschr.,* **69**, 1039-1045(1991).
22. Bruckdorfer, K. R. : Free radicals, lipid peroxidation and atherosclerosis. *Curr. Opin. Lipidol.*, **1**, 529-535 (1990).
23. Esterbauer H., Puhl, H., Dieber-Rotheneder, M. and Striegl - Waeg, G. G.(1991) : Role of vitamin E in preventing the oxidation of low-density lipoprotein, *Am. J. Clin. Nutr.,* **53**, 314S-321S(1991).
24. Esterbauer, H., Streigel, G., Puhl, H., Oberreither, S., Rotherneder, M., El-Saadani, M. and Urgens, G.(19 89) : The role of vitamin E and carotenoids in preventing oxidation of low density lipoproteins, *Ann. N. Y. Acad. Sci.,* **570**, 254-267(1989).
25. Salmi, H. A. and Sarna, S.(1982) : Effect of silybin on chemical, functional, and morphological alterations of the liver, *Scand. J. Gastroenterol.*, **17**, 517-521(1982).
26. Rauen, H. M. and Schriewer, H. : Die Antihepatotoxische Wirkung von parenteral verabreichtem silybin bei der Leberchadigung der Ratte durch CCl_4, *Arzneimitteforsch,* **23**, 148-149(1973).
27. Rauen, H. M. and Schriewer, H. : Die antihepatotoxische Wirkung von silybin bei experimentellen Leberschagungen der Ratte durch Tatrachlorkohlen stoff, D-Galaktosamin und Allylalkohol, *Arzneimittelf-orsch.,* **21**, 1194-1198(1971).
28. Mourelle, M., Murrel, P., Favari, L. and Franco, T. : Prevention of CCl_4-induced cirrhosis by silymarin, *Fund. Clin. Pharmacol.,* 3, 183(1989).
29. 이백천 : 엉겅퀴에서 정제한 Silymarin의 항산화 효과, 경성대학교 대학원 박사학위논문. p.p. 1-84(1996).
30. Havel, R. J., Eder, H. A. and Bragdon, J. H. : The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum, *J. clin. Invest.,* **34**, 1345-1352(1995).
31. Esterbauer, H., Striegl, G., Puhl, H. and Rotheneder, M. : Continous monitoring of *in vitro* oxidation of human low density lipoprotein, *Free Rad. Res. Commun,* **6**, 67-75(1989).
32. Yaki, K. : A simple flavorometric assay for lipoperoxide in blood plasma, *Biochem. Med.,* **15**, 212-218 (1976).
33. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randell, R. J. : Protein measurement with the Folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.,* **193**, 265-275(19 51).
34. Mabry, T. J., Markham, K. R. and Thomas, M. B. : The Systematic Identification of Flavonoids, Spriger-Verdag, Berlin. Heidelberg. New York(1970).
35. Geisman, T. A. : The chemistry of flavonoid compound, Pergmon press, 107-131(1962).
36. Takemoto, T., Ikegawa, S. and Nomoto, K. : Studies on constituent of *Silybum marianum*(L.), *Yakugagu zasshi,* 95, 1017-1021(1975).
37. Jialal, I. and Scaccini, C. : Antioxidants and atherosclerosis. *Current Opin. Lipidologe,* 3, 324-330(19 92).
38. Parthasarathy, S., Young, S. G., Witztum, J. L., Pittman. R. C. and Steinberg, D. : Probucol inhibits oxidative modification of low density lipoprotein. *J. Clin. Invest.,* 77, 641-651(1986).
39. Esterbauer, H., Puhl, H., Dieber-Rotheneder, M., Waeg, G. and Rable, H. : Effect of antioxidants on oxidative modification of LDL, Ann. Med., 23, 573-581(1991).
40. Nikino, N., Kiso, Y., Wagner, H. and Fiebig, M : Antihepatotoxic actions of flavonolignans from *silybum marianum* fruits, *Planta Med.,* **50**, 248-250(1984).